



(6)

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number **09084582 A**(43) Date of publication of application: **31.03.97**

(51) Int. Cl

C12N 5/10
C07K 14/505
C12P 21/02
// C07H 21/04
C12N 9/10
C12N 15/09
(C12N 5/10 , C12R 1:91), (C12P
21/02 , C12R 1:91)

(21) Application number **07266138**(22) Date of filing: **21.09.95**(71) Applicant: **KIRIN BREWERY CO LTD**

(72) Inventor: **TOKUGAWA KAZUHISA**
INOUE NOBORU
TAKEUCHI MAKOTO
TANIGUCHI NAOYUKI

(54) **ANIMAL CELL HAVING STRENGTHENED
 TRANSGLYCOSYLASE ACTIVITY,
 GLYCOPROTEIN HAVING MODIFIED SUGAR
 CHAIN, AND PRODUCTION OF THE ANIMAL
 CELL**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new animal cell having strengthened transglycosylase activity and capable of producing a glycoprotein such as erythropoietin having a modified structure of sugar chain and expectable for the extension of clearance time from blood by introducing a transglycosylase gene.

SOLUTION: A new animal cell derived from the strain CHO-K1, which has a transglycosylase activity

strengthened by introducing a gene of a transglycosylase (e.g. N-acetylglucosaminyl transferase V). Culturing of the cell can produce various glycoproteins which are useful for a therapeutic treatment or an industrial purpose, such as erythropoietin which has a modified structure and whose clearance from blood is expected to be extended. The animal cell is obtained by synthesizing an oligonucleotide probe based on a partial amino acid sequence of a transglycosylase of human N-acetylglucosaminyl transferase V, etc., searching a cDNA library of a human fetus liver using the obtained probe, selecting a gene of the transglycosylase, integrating the gene into a vector and introducing the vector into an animal cell.

COPYRIGHT (C)1997,JPO

特開平9-84582

(43) 公開日 平成9年(1997)3月31日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 5/10	Z N A		C 1 2 N 5/00	Z N A B
C 0 7 K 14/505			C 0 7 K 14/505	
C 1 2 P 21/02			C 1 2 P 21/02	C
// C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 N 9/10			C 1 2 N 9/10	
審査請求 未請求 請求項の数 8 F D (全 7 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願平7-266138	(71) 出願人	000253503 麒麟麦酒株式会社 東京都中央区新川二丁目10番1号
(22) 出願日	平成7年(1995)9月21日	(72) 発明者	徳川 和久 神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒麟麦酒株式会社基盤技術研究所内
		(72) 発明者	井上 登 神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒麟麦酒株式会社基盤技術研究所内
		(72) 発明者	竹内 誠 神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒麟麦酒株式会社基盤技術研究所内
		(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔 (外1名) 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖転移酵素活性を強化した動物細胞、糖鎖改変糖蛋白質ならびにその製造方法

(57) 【要約】

【解決手段】 糖転移酵素遺伝子を導入することにより、当該糖転移酵素活性を強化した動物細胞、当該細胞より得られる糖鎖の構造が改変された糖蛋白質ならびにその製造方法。

【効果】 本発明によれば、糖転移酵素 (N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ V) 遺伝子を動物細胞に導入することにより該酵素活性を高レベルに維持する動物細胞が得られ、また該細胞を培養することにより、治療上または産業上有用な種々の糖鎖改変蛋白質を得ることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 糖転移酵素遺伝子を導入することにより、当該酵素活性を強化した動物細胞。

【請求項2】 糖転移酵素が、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ Vである請求項1記載の動物細胞。

【請求項3】 細胞株が、CHO-K1株に由来するものである請求項1記載の動物細胞。

【請求項4】 糖転移酵素の遺伝子を動物細胞に導入し、該細胞を培地に培養し、培養物より糖鎖の構造が改変された糖蛋白質を得ることを特徴とする糖鎖改変糖蛋白質の製造方法。

【請求項5】 糖転移酵素が、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ Vである請求項4記載の方法。

【請求項6】 細胞株が、CHO-K1株に由来するものである請求項4記載の方法。

【請求項7】 請求項4～6のいずれかに記載の方法により得ることのできる糖鎖改変糖蛋白質。

【請求項8】 糖蛋白質がエリスロポエチン (EPO) である、請求項7記載の糖鎖改変糖蛋白質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、糖転移酵素遺伝子を導入することにより、当該糖転移酵素活性を強化した動物細胞、当該細胞より得られる糖鎖の構造が改変された糖蛋白質ならびにその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、遺伝子工学を応用した有用組み換え蛋白質の生産においては、蛋白質に付加する糖鎖の役割の重要性が強く認識されている。組み換え蛋白質を生産するにあたり、宿主として大腸菌などの原核生物を用いた場合は、通常、蛋白質に糖鎖が付加することはない。また、酵母などの下等真核生物を宿主とした場合は、蛋白質に付加する糖鎖が動物細胞のものとは大きく異なることが知られている。そのため、ヒト由来のサイトカイン類など少量で高付加価値のある組み換え蛋白質の生産では、動物細胞を宿主とする方法に注目が集まっている。

【0003】蛋白質への糖鎖の付加は、動物細胞の小胞体、ゴルジ装置に局在する数多くの糖転移酵素の寄与による複雑な機構で行われており、現在、動物細胞由来の各種糖転移酵素の精製と遺伝子クローニング、クローン化された遺伝子の大腸菌や動物細胞での発現、糖鎖合成に関する変異株の作出などの研究が盛んになってきている。これまで報告されている例としては、 α -1, 3フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子をクローニングし、動物細胞で発現させた例 (Natsuka, S. et al., J. Biol. Chem.; 269, 16789-16794, 1994)、シアリルトランスフェラーゼをコードするDNA配列を真核細胞

胞中でシアリル化される糖蛋白質をコードするDNA配列と共に発現させ、高度にシアリル化された糖蛋白質を得た例 (特開平6-105692)、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをレクチン存在下で培養して、レクチン耐性株を得ることにより、糖鎖合成能が変化したハイブリドーマを作出した例 (特開平6-90782) 等がある。

【0004】動物細胞で生産される蛋白質の糖鎖構造について、人為的な制御あるいは改変を加えることは、個々の蛋白質分子に付加した糖鎖の型をすべて同一とすることにより組み換え蛋白質としての均一性を向上させたり、糖鎖の分岐構造を増やすことにより血中クリアランス時間の延長が期待できるなど、産業上高い有用性がある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、糖転移酵素活性を遺伝子工学的に制御した動物細胞を得、該細胞から糖鎖の構造が改変された糖蛋白質を得ることにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、糖転移酵素であるN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ Vの遺伝子を動物細胞に導入することにより、該細胞から糖鎖の分岐構造が増大した糖蛋白質が得られることを見出し、本発明を完成した。

【0007】即ち、本発明は、糖転移酵素の遺伝子を導入することにより、当該酵素活性を強化した動物細胞である。本発明はまた、糖転移酵素の遺伝子を動物細胞に導入し、該細胞を培地に培養し、培養物より糖鎖の構造が改変された糖蛋白質を得ることを特徴とする糖鎖改変糖蛋白質の製造方法である。

【0008】さらに、本発明は、上記方法により得られる糖鎖の構造が改変された糖蛋白質である。本発明においては、糖転移酵素として、具体的にはN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ V (以下、GnT-Vと略す) を用いる。GnT-Vは、2本鎖構造のN-結合糖鎖にN-アセチルグルコサミニル基を転移することにより、3本鎖構造を生じさせる (図1)。GnT-Vの遺伝子は、1993年にジョージア大学のマイケル・ピアスらによりラットから (Shoreibah et al., J. Biol. Chem. 268, 15381-15385, 1993, 特表平6-510914)、1994年に大阪大学医学部の谷口らによりヒトから (Saito et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 198, 318-327, 1994)、そのcDNAがそれぞれクローニングされている。

【0009】上記遺伝子を動物細胞に導入し、発現させるためのベクターとして動物細胞用発現ベクターを用いる。動物細胞用発現ベクターには、動物ウイルスが利用され、具体的にはSV40、BPV (ウシバビローマウ

イルス)、アデノウイルス、レトロウイルス系が挙げられる。動物ウイルスは、一般に宿主細胞で働くプロモーター、RNAスプライシングシグナルとポリA付加シグナル、さらにプロモーターの活性を増大させるエンハンサーなど遺伝子発現に必要なシグナルに加えて自己複製能を有するもつため、遺伝子が細胞内で増殖し、遺伝子発現量を増加させることができる。ウイルスによって増殖可能な宿主細胞が限られており、宿主細胞によってベクターとして用いるウイルスを選ぶ必要がある。

【0010】プロモーターやエンハンサーとしては、LTR(レトロウイルスのlong terminal repeat)、SV40、CMV(サイトメガロウイルス)、MT(メタロチオネイン)、アクチンなどのプロモーターや、LTR、SV40、CMVなどのエンハンサー配列がよく用いられている。動物細胞用発現ベクターとしては、大別すると、その一つは宿主DNA内に組み込まれて発現するタイプ、もう一つは宿主DNAに組み込まれることなく細胞内でエピソームとして増殖するタイプがある。これらは、宿主細胞の遺伝子欠失を相補したり、代替する遺伝子、例えばジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)遺伝子、Ecogpt遺伝子、Neo遺伝子等を選択マーカーとして利用している。

【0011】本発明において使用する動物細胞用発現ベクターは、具体的にはニワトリのβ-アクチン遺伝子プロモーターの一部の塩基配列をウサギのβ-グロビン由来の遺伝子に置き換えることにより外来遺伝子の高発現を可能にするベクターである、pCAGGS(Niwa et al., Gene, 108, 193-200 (1991)、特開平03-168087)が挙げられるが、その他動物細胞用発現ベクターであれば特に限定されない。

【0012】本発明において、遺伝子を導入する動物細胞としては、糖蛋白質性の有用物質の生産に利用されている細胞、あるいは利用可能性のある細胞であればよく、具体的には、CHO細胞(チャイニーズハムスター卵巣細胞)、サルVer o細胞、マウスL細胞、BHK、φ2(NIH3T3)、マウスC127細胞、サルCOS細胞、Hella細胞、マウスミエロマ等が挙げられる。

【0013】本発明において、糖鎖の構造が改変される糖蛋白質としては、治療目的として有用な、ヒト・エリスロポエチン、ヒト・スロンボポエチン、インターフェロン群、インターロイキン群、レクチン、インターロイキン1レセプター、インターロイキン4レセプター、インターロイキン7レセプター、腫瘍壊死因子レセプター、CD4およびそれらの改変体が挙げられる。

【0014】糖鎖の構造の改変とは、具体的には、糖鎖の分岐構造の増大をいう。このように糖鎖の分岐構造の増大した糖蛋白は、生体内での活性の増大、血液中でのクリアランス時間の延長という点において優れている(Takeuchi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 7

819-7822, 1989)。動物細胞への遺伝子導入の方法としては、最も一般的なリン酸カルシウム法のほか、マイクロインジェクション法、プロトプラスト融合法、リポソーム融合法、赤血球ゴースト融合法、エレクトロポレーション法等が用いられる。

【0015】酵素GnT-V活性の測定は、西河らの方法(Nishikawa et al., Biochim. Biophys. Acta, 1035, 313-318, 1990)に従う。即ち、2-アミノピリジンにより還元末端を蛍光ラベルしたアシアロ・アガラクト2本鎖糖鎖、及びUDP-N-アセチルグルコサミンを緩衝液中にて細胞抽出液と反応させた後、反応生成物を高速液体クロマトグラフィーにより同定・定量することにより行いうる。

【0016】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、これらの実施例は本発明の範囲を何等限定するものではない。

【実施例1】糖転移酵素遺伝子を導入した動物細胞の調製

(1) ヒトGnT-V cDNAの取得(クローニング)
ヒトGnT-V cDNAの取得法については、既に報告されている(Saito et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 198, 318-327, 1994)。具体的には、ヒト肺癌由来QG細胞の培養液上清から得られたGnT-V(特開平6-197756号公報)の部分アミノ酸配列からオリゴヌクレオチドプローブを作成し、ヒト肺癌細胞のcDNA、ヒト胎児肝臓のcDNAライブラリー、ヒト神経芽細胞腫由来の細胞株であるGOTO細胞のRNAに対して、PCR又はブラークハイブリダイゼーションを行うことによりヒトGnT-V cDNAの全長を得た(図2~3)。

【0017】(2) 糖転移酵素遺伝子の動物細胞への導入

(1)で得られたヒトGnT-V cDNAを、動物細胞用発現ベクターpCAGGS(Niwa et al., Gene, 108, 193-200(1991))に組み込み、ネオマイシン耐性ベクターpSTneoB(Katoh et al., Cell Structure and Function, 12, 575-580, 1987)と共に燐酸カルシウム法を用いて、組み換えヒト・エリスロポエチン(EP O)を生産するCHO細胞であるCHO-K1の亜株[Lin et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82, 7580-7584 (1985)、理化学研究所 開発銀行 細胞カタログ No. 7, p. 73, 1994]に対して遺伝子導入を行った。G418耐性で選抜した遺伝子導入株約50株について西河らの方法(Nishikawa et al., Biochim. Biophys. Acta, 1035, 313-318, 1990)に従い、2-アミノピリジンにより還元末端を蛍光ラベルしたアシアロ・アガラクト2本鎖糖鎖(図1中、Asnを2-アミノピリジンに置換したもの)、及びUDP-N-アセチルグルコサミンを緩衝液中にて細胞抽出液と反応させた後、反応生成物を高速液体

クロマトグラフィーにより同定・定量することにより、細胞のGnT-V活性を測定し、高活性の維持されるものを2株選抜した。

【0018】上述の2株（#2、#32）及びに対照株（遺伝子導入なし）について、細胞破碎抽出物のGnT*

GnT-V遺伝子導入CHO細胞のGnT-III, IV, V活性

細胞	GnT活性 (pmol/hour/mg protein)		
	GnT-III	GnT-IV	GnT-V
#2	n.d.	34	2765
#32	n.d.	39	2363
対照1	n.d.	41	835
対照2	n.d.	34	1137

基質濃度：800 μ M

n.d.：検出できず

【0020】遺伝子導入株#2、#32株においては、ネオマイシン耐性遺伝子のみを導入したコントロール株に対して2～3倍の単位蛋白質量あたりの活性が観察され、また、同時に測定可能であるGnT-III、GnT-IV活性については対照株との間に差は観察されず、酵素活性の増大がGnT-V遺伝子の導入に起因するものであることが強く示唆された。

【0021】細胞から総RNAを抽出し、ヒトGnT-V構造遺伝子のEcoRI-SmaI断片をプローブとして常法によりノーザンブロットを行った結果、#2、#32株においては図5に示すごとく明瞭なバンドが観察され、導入した遺伝子の転写が行われていることが明らかであった。

【0022】〔実施例2〕 組み換えタンパク質（EPO）の生産

#2株、#32株をそれぞれD-MEM/F-12培地（75nMのメトトレキサート、1mg/mlのG418、10%の非動化仔牛血清を含む）50mlを加えた175cm² フラスコにて37℃、5%CO₂の条件でほぼフラスコ底面いっぱいに培養した後、非動化仔牛血清を含まない上記培地に交換した後、37℃、5%CO₂下に11日間保持した。培養液上清を回収後、遠心分離により細胞その他固形物を沈殿させ、得られた上清を膜を用いて200倍に濃縮の後、逆相カラム（Vydac C4）を用いてEPO蛋白質を精製した。精製したエリスロポエチンの脱塩を行ない、等電点電気泳動の試料とした。ゲルは、5.0gの尿素と780ulのPharmalyte 2.5-5（Pharmacia）を含む10.5mlの水溶液で膨潤したCle anGel IEF（Pharmacia）を用いた。この操作により、シアル酸の付加数に応じてEPOを幾つかのisoformに分離することができる。泳動後、タンパク質をゲルからPV

*-III, IV, V活性を測定した。結果を表1に示す。また、高速液体クロマトグラフを用いたGnT-III, IV, V活性測定の一例を図4に示す。

【0019】

【表1】

DF膜に転写し、抗EPO抗体を用いた方法でエリスロポエチンを検出した。結果を図6に示した。その結果、GnT-V高活性株である#2、#32によって生産されたEPOでは、シアル酸の付加が9個であるバンドが消失していた。シアル酸は分岐した糖鎖の各末端部分に1分子ずつ結合していることが知られている。EPOでは1分子中に3本のN-リンク糖鎖と1本のO-リンク糖鎖が存在し、N-リンク糖鎖がすべて4本鎖構造を取った場合、1分子中のシアル酸の合計は14個となる。従ってシアル酸の付加数の少ない分子種の割合が低下しているということは、糖鎖の分岐構造の増大を示唆するものである。

30 【0023】

【発明の効果】本発明によれば、糖転移酵素（N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ V）遺伝子を動物細胞に導入することにより該酵素活性を高レベルに維持する動物細胞が得られ、また該細胞を培養することにより、治療上または産業上有用な種々の糖鎖改変蛋白質を得ることできる。

【図面の簡単な説明】

【図1】GnT-Vの触媒する化学反応を示す。

【図2】ヒトGnT-V cDNAの全長配列を示す。

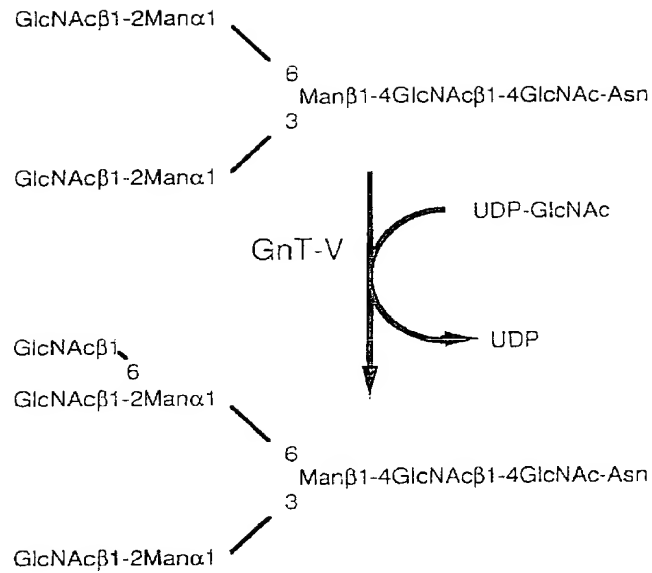
40 【図3】ヒトGnT-V cDNAの全長配列（続き）を示す。

【図4】高速液体クロマトグラフを用いたGnT-III, IV, V活性測定の一例を示す。

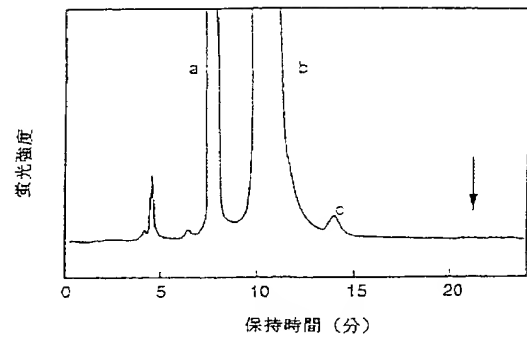
【図5】ノーザンブロットによる遺伝子の発現を示す電気泳動写真である。

【図6】等電点電気泳動による、EPOのisoform分布を示す電気泳動写真である。

【図 1】

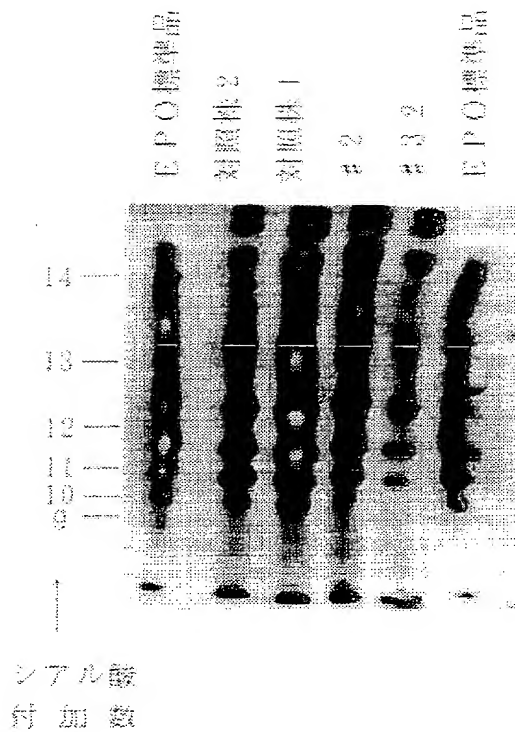


【図 4】



- a : GnT-V 反応産物のピーク
 b : 基質のピーク
 c : GnT-IV 反応産物のピーク
 矢印 : GnT-III 反応産物のピーク

【図 6】



図面代用写真

【図2】

【図5】

1	NCCGGCTGAAGCATCAGAATGGAAGTGAGGAAAGGCAACCAGCTGACACAGGAGCCAGAG	60
1		1
61	TGAGACCAGCAGACTCTCACACTCAACCTACACCATGAATTTGTGTCTATCTTCTACGCG	120
1		1
121	TTAAGAGCCAAGGACAGGTGAAGTTGCCAGAGAGCAATGGCTCTCTTCACTCCGTGGAAG	180
1	M A L F T P W K	8
181	TTGTCCTCTCAGAAGCTGGGCTTTTTCCTGCTGACTTTTGGCTTCATTGGGGTATGATG	240
9	L S S Q K L G F F L V T F G F I W G M M	28
241	CTTCTGCACTTTACCATCCAGCAGCGAAGCTCAGCCTGAAAGCAGCTCCATGCTGCGCGAG	300
29	L L H F T I Q Q R T Q P E S S S M L R E	48
301	CAGATCCTGGACCTCAGCAAAAGGTACATCAAGGCACTGGCAGAAGAAAACAGGAATGTG	360
49	Q I L D L S K R Y I K A L A E E N R N V	68
361	GTGGATGGGCCATACGCTGGAGTCATGACAGCTTATGATCTGAAGAAAACCTTGCTGTG	420
69	V D G F Y A G V M T A Y D L K K T L A V	98
421	TTATTAGATAACATTTTGCAGCGCATTGGCAAGTTGGAGTCGAAGGTGGACAATCTTGT	480
89	L L D N I L Q R I G K L E S K V D N L V	108
481	GTCAATGGCACCAGCAAACTCAACCACTCCACTACAGCTGTTCCAGCTTGGTTGGCA	540
109	V N G T G T N S T N S T T A V P S L V A	128
541	CTTGAGAAAATTAATGTGGCAGATATCATTAAAGGAGCTCAAGAAAAATGTGTATTGCT	600
129	L E K I N V A D I I N G A Q E K C V L P	148
601	CCTATGGACGGCTACCCTCACTGTGAGGGAAAGATCAAGTGSATGAAAGACATGTGGCCT	660
149	P M D G Y P H C E G K I K W M K D M W R	168
661	TCAGATCCCTGCTACGCAGACTATGGAGTGGATGGATCCACCTGCTCTTTTTTATTAC	720
169	S D P C Y A D Y G V D G S T C S F F I Y	188
721	CTCAGTGAGGTTGAAAATTTGGTGTCTCATTACCTTGGAGAGCAAAAAATCCCTACGAA	780
189	L S E V E N W C P H L P W R A K N P Y E	208
781	GAAGCTGATCATAATTATTGGCGGAAATTCGTACAGATTTTAATATTCTCTACAGTATG	840
209	E A D H N S L A E I R T D F N I L Y S M	228
841	ATGAAAAAGCATGAAGAATTCGGGTGGATGAGACTACGGATCCGGCGAATGGCTGACGCA	900
229	M K K H E E F R W M R L R I R R M A D A	248
901	TGGATCCAAGCAATCAAGTCCCTGGCAGAAAAGCAGAACCTTGAAAAGAGAAAGCGGAAG	960
249	W I Q A I K S L A E K Q N L E K R K R K	268
961	AAAGTCCTCGTTCACCTGGGACTCCTGACCAAGGAATCTGGATTTAAGATTGCAGAGACA	1020
269	K V L V H L G L L T K E S G F K I A E T	288
1021	GCTTTCAGTGGTGGCCCTCTTGGTGAATTAGTTCAATGGAGTGATTTAATTACATCTCTG	1080
289	A F S G G P L G E L V Q W S D L I T S L	308
1081	TACTTACTGGGCCATGACATTAGGATTTTACGCTTCACTGGCTGAGCTCAAGGAAATCATG	1140
309	Y L L G H D I R I S A S L A E L K E I M	328
1141	AAGAAGGTTGTAGGAAACCGATCTGGCTGCCCACTGTAGGAGACAGAATTGTTGAGCTC	1200
329	K K V V G N R S G C P T V G D R I V E L	348
1201	ATTTACATTGATATTGTAGGACTTGCTCAATTCAAGAAAACCTTGGACCATCCTGGGTT	1260
349	I Y I D I V G L A Q F K K T L G P S W V	368
1261	CAITACCAGTGCATGCTCCGAGTCCTTGATTCAATTGGTACTGAACCCGAATTTAATCAT	1320
369	H Y Q C M L R V L D S F G T E P E F N H	388
1321	GCAAATTATGCCCAATCGAAAGGCCACAAGACCCCTTGGGGAAAATGGAATCTGAACCT	1380
389	A N Y A Q S K G H K T P W G K W N L N P	408

図5代用写真

【図 3】

1381	CAGCAGTTTTATACCATGTTCCCTCATACCCAGACAACAGCTTTCTGGGGTTTGTGGTT	1440
409	Q Q F Y T M F P H T P D N S F L G F V V	428
1441	GAGCAGCACCTGAACTCCAGTGATATCCACCACATTAATGAAATCAAAGGCAGAACCAG	1500
429	E Q H L N S S D I H H I N E I K R Q N Q	448
1501	TCCCTTGTGTATGGCAAAGTGGATAGCTTCTGGAAGAATAAGAAGATCTACTTGGACATT	1560
449	S L V Y G K V D S F W K N K K I Y L D I	468
1561	ATTCACACATACATGGAAGTGCATGCAACTGTTTATGGCTCCAGCACAAAGAATATTCCC	1620
469	I H T Y M E V H A T V Y G S S T K N I P	488
1621	AGTTACGTGAAAAACCATGGTATCCTCAGTGGACGGGACCTGCAGTTCCTTCTTCGAGAA	1680
489	S Y V K N H G I L S G R D L Q F L L R E	508
1681	ACCAAGTTGTTTGTGGACTTGGGTTCCCTTACGAGGGCCCAGCTCCCTTGGAGCTATC	1740
509	T K L F V G L G F P Y E G P A P L E A I	528
1741	GCAAATGGATGTGCTTTTCTGAATCCCAAGTTCAACCCACCCAAAAGCAGCAAAAACACA	1800
529	A N G C A F L N P K F N P P K S S K N T	548
1801	GACTTTTTTCATTGGCAAGCCAACCTCTGAGAGAGCTGACATCCCAGCATCCTTACGCTGAA	1860
549	D F F I G K P T L R E L T S Q H P Y A E	568
1861	GTTTTTCATCGGGCGGCCACATGTGTGGACTGTTGACCTCAACAATCAGGAGGAAGTAGAG	1920
569	V F I G R P H V W T V D L N N Q E E V E	588
1921	GATGCAGTGAAAGCAATTTTAAATCAGAAGATTGAGCCATACATGCCATATGAATTTACG	1980
589	D A V K A I L N Q K I E P Y M P Y E F T	608
1981	TGCGAGGGGATGCTACAGAGAATCAATGCTTTTCATTGAAAAACAGGACTTCTGCCATGGG	2040
609	C E G M L Q R I N A F I E K Q D F C H G	628
2041	CAAGTGATGTGGCCACCCCTCAGCGCCCTACAGGTCAAGCTTGCTGAGCCCGGGCAGTCC	2100
629	Q V M W P P L S A L Q V K L A E P G Q S	648
2101	TGCAAGCAGGTGTGCCAGGAGAGCCAGCTCATCTGCGAGCCTTCTTTCTCCAGCACCTC	2160
649	C K Q V C Q E S Q L I C E P S F F Q H L	668
2161	AACAAGGACAAGGACATGCTGAAGTACAAGGTGACCTGCCAAAGCTCAGAGCTGGCCAAG	2220
669	N K D K D M L K Y K V T C Q S S E L A K	688
2221	GACATCCTGGTGGCCCTCCTTTGACCCTAAGAATAAGCACTGTGTGTTTCAAGGTGACCTC	2280
689	D I L V P S F D P K N K H C V F Q G D L	708
2281	CTGCTCTTCAGCTGTGCAGGCGCCACCCAGGCACCAGAGGGTCTGCCCTGCGGGGAC	2340
709	L L F S C A G A H P R H Q R V C P C R D	728
2341	TTCATCAAGGGCCAGGTGGCTCTCTGCAAAGACTGCCTATAGCAGCTACCTGCTCAGCCC	2400
729	F I K G Q V A L C K D C L *	742
2401	TGCACCATGCTGCTGGGGAAGACAGTGGCCCC	2432
742		742

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09		9162-4B	C 1 2 N 15/00	A
(C 1 2 N 5/10	Z N A			
C 1 2 R 1:91)				
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:91)				

(72)発明者 谷口 直之
大阪府豊中市上野東 2 - 19 - 32 - 201